

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18408

研究課題名(和文)脳転移開始細胞を用いた脳転移の機序解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of brain metastasis using metastasis-initiating cells

研究代表者

岩田 亮一 (IWATA, Ryoichi)

関西医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：60580446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：転移性脳腫瘍の患者は増加傾向で、脳転移に対する有効な治療法が不足している。転移性脳腫瘍の発生機序は不明で、脳転移を抑制する薬剤はいまだ開発されていない。研究代表者は転移脳腫瘍患者の腫瘍組織よりがん幹細胞株を樹立した。これらはマウス脳に多発性脳腫瘍を形成することから、脳転移開始細胞と命名した。免疫関連分子であるICOSLGは、免疫応答のみならず細胞の浸潤や遊走に関与していることが報告されている。本研究は、脳転移開始細胞がICOSLGを発現することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医学の進歩により、がんの原発巣の制御は改善され生存率は延長している。しかし、脳転移を来した場合は5年生存率12%といまだ予後不良である。脳転移を抑制する治療法はいまだ開発されていない。転移にはがん幹細胞が関与していることが提唱されており、脳転移巣には脳転移開始細胞が存在すると考えられる。本研究は、新たな脳転移の治療の分子標的を明らかにした。これまでにない、脳転移を抑制する新しいコンセプトの治療法の開発に広く波及できる。

研究成果の概要(英文)：The number of patients with metastatic brain tumors is increasing, and there is a lack of effective treatments for brain metastases. The pathogenesis of metastatic brain tumors is unknown, and drugs that suppress brain metastases have not yet been developed. We established a cancer stem cell line from the tumor tissue of patients with metastatic brain tumors. They were named brain metastasis-initiating cells because they form multiple brain tumors in the mouse brain. It has been reported that ICOSLG, an immune-related molecule, is involved in cell infiltration and migration, as well as immune response. This study revealed that brain metastasis-initiating cells expressed ICOSLG.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳転移 がん

## 1. 研究開始当初の背景

近年、原発癌の制御は分子標的薬の発達により生存期間が延長している。しかし、脳転移の機序はいまだ不明な点が多く、脳転移を抑制する薬剤の開発はいまだ行われていない。また脳は脳血液関門により薬剤が到達しにくく、抗がん剤にも不応性である。そのため手術と放射線治療が標準的治療であり、転移性脳腫瘍に対する治療は十分ではない。一方でがんの発生かつ治療抵抗性の根源として、がん幹細胞の存在が提唱されている。そのため、がん幹細胞を標的とした治療薬の開発が世界中で行われている。しかし、転移性脳腫瘍からがん幹細胞を単離し機能解析を行った研究は少ない。脳転移巣には脳指向性をもつがん幹細胞が存在していると考えられ、脳転移開始細胞と命名されている。しかし脳転移開始細胞を用いた研究はほとんど行われていない。

研究代表者はこれまでにグリオーマ患者の手術検体からグリオーマがん幹細胞を単離し、その機能解析を行ってきた (Cancer Cell 2016)。がん幹細胞を単離する手法を、転移性脳腫瘍にも応用し、がん幹細胞株を樹立してきた (Medical Molecular Morphology 2017)。脳転移巣から樹立したがん幹細胞は、マウスに多発性脳腫瘍を形成することから脳転移開始細胞と命名した (Cytometry Research 2018)。脳転移開始細胞を用いて脳転移の機序解明を行うべく、浸潤に関連する分子について解析を行った結果、免疫関連分子である ICOSLG (Inducible costimulatory ligand) が発現していることを見出した。

## 2. 研究の目的

がん細胞が脳転移を起こすには複数の過程が必要であり、脳転移の機序の解明が難しい要因のひとつである。また、脳転移を再現できる実験系のモデルが不足していることも問題である。がん幹細胞は転移にも重要な役割を果たしていると考えられている。脳転移に必要な過程として、原発巣のがん細胞が上皮間葉転換により浸潤・遊走能を得て、血管から血流に至る。足場のない血流内で生存しつづけるための能力、脳血管末梢で捕捉され、接着し浸潤・増殖により脳転移巣を形成する能力。これらの能力を自由自在に変化するためには、自己複製能、分化能を有するがん幹細胞が適していると考えられる。さらには脳転移巣には脳指向性のがん幹細胞が濃縮されていると予想される。そのため脳転移巣から脳転移開始細胞を単離し、その機能解析を行うことで脳転移の機序解明と新規治療法の開発に寄与するのではないかと考えている。

本研究は、脳転移という現象に関わる分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。そのために、脳転移開始細胞が発現する分子を網羅的に解析した。

## 3. 研究の方法

(1) 転移性脳腫瘍由来の脳転移開始細胞は三次元スフェア培養法を用いて樹立した (Neuro-Oncology 2020)。手術で切除されたがん組織 (0.1-1 g) をはさみにより細かく刻んだ。細切された組織を細胞剥離液 (Accumax(TM); ナカライテスク) 2 mL を入れた試験管に移し、37 °C の恒温槽で 5 分間振盪 (20 回/分) した。細胞培養液 8 mL を加え混和し、遠心 (40 ×g, 5 分) した。上清を捨て、細胞培養液 10 mL を加え混和し、超低接着表面ディッシュ (100 mm; Corning) で培養した。培養は、5% CO<sub>2</sub> / 95% 空気、37 °C の湿潤な環境で行った。細胞培養液は、D-MEM/Ham 's F-12 (和光純薬) に、NaHCO<sub>3</sub> (49 mM)、グルコース (26 mM)、L-グルタミン (3 mM)、MACS NeuroBrew-21 (5 mL; Miltenyi Biotec)、上皮成長因子 (EGF, 20 ng/mL; PeproTech)、線維芽細胞増殖因子 (bFGF, 20 ng/mL; PeproTech)、およびペニシリン (100 U/mL) とストレプトマイシン (0.1 mg/mL) を添加したものを使用した。

(2) ヘルシンキ宣言に基づいて関西医科大学の医学倫理審査委員会の承認のもと、同一患者における肺癌と脳転移のホルマリン固定パラフィンブロックの検体を 3 セット使用した。組織は全例で腺癌であった。パラフィンブロックの検体から RNA を抽出し、nCounter システム (NanoString Technologies) を用いて、遺伝子発現を解析した。パラフィンブロックから 5 μm の切片を薄切した。NucleoSpin total RNA FFPE kit (Macherey-Nagel) を用いて、RNA を抽出した。分光光度計 (Nanodrop 1000; Thermo Fisher Scientific) を用いて、RNA の品質を確認した。上皮間葉転換マーカー (Snail, Slug, TWIST, ZEB1 など)、免疫関連分子 (STAT family, ICOSLG, TNF superfamily など)、がん幹細胞マーカー (CD133, CD44, ALDH1A3 など) を搭載した nCounter のカスタムパネルを作製した。RNA はプローブセットと 67 で 16 時間かけてハイブリダイズした。Sample Prep Station (NanoString Technologies) を用いて、ハイブリダイズしたを精製し、解析用カートリッジの表層に固定した。Digital Analyzer (NanoString Technologies) を用いて、スキャンし、標的配列をカウントした。取得したデータは nSolver analysis software version 4.0 (NanoString Technologies) を用いて解析した。

(3) RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて、がん幹細胞から RNA を抽出した。バイオアナライザ電気泳動システム (Agilent 2100; Agilent) を用いて、RNA の品質を確認した。strand-specific ライブラリー調製法 (NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module; New England Biolabs) でシーケン斯拉イブラリーを作製した。次世代シーケンサー (NovaSeq 6000; Illumina) を用いて、ライブラリー調製したサンプルの塩基配列を 1 検体あたり 12 GB で取得した。ソフトウェア

ア FastQC を用いて、クオリティスコアを確認し、シーケンスの品質に問題がなかった。ソフトウェア Trimmomatic を用いて、シーケンスリードをトリミングした。ソフトウェア HISAT2 を用いて、トリミング後のシーケンスリードをリファレンスゲノム (hg38) へマッピングした。リードのマッピング率は 98.1-98.5% であった。ソフトウェア featureCounts を用いて、マッピングされた raw リード数をカウントした。ソフトウェア featureCounts を用いて、マッピングされたフラグメントのカウントを行い、TPM 値を算出した。

(4) 免疫関連分子である ICOSLG (CD275) を検出するための一次抗体として、抗 CD275 抗体 (LS-B2001; LSBio) を 50 倍に希釈して使用した。がん幹細胞マーカーである CD44 を検出するための一次抗体として、抗 CD44 抗体 (ab189524; abcam) を 400 倍に希釈して使用した。二次抗体は、Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG グロブリン抗体 (A32766; Invitrogen) および Alexa Fluor 555 標識抗ウサギ IgG グロブリン抗体 (A32794; Invitrogen) を使用した。脳転移開始細胞を 4% パラホルムアルデヒド溶液で固定した。0.2% TritonX-100 により細胞膜の透過処理を行った。10% 正常口バ血清 (D9663; Sigma-Aldrich) によりブロッキングを行い、一次抗体 (抗 CD275 抗体および抗 CD44 抗体) と蛍光二次抗体を反応させた。DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole, 1 μg/ml; 同仁化学研究所) を用いて細胞核を染色した。蛍光は共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510 META; Carl Zeiss) を用いて観察し、画像を取得した。

#### 4. 研究成果

(1) 肺癌原発巣と脳転移巣における遺伝子発現量の変動を解析した。原発巣において、ICOSLG および上皮間葉転換マーカーである SNAI1 の発現量が高かった。脳転移巣において、EMT マーカーである SNAI2 と E-cadherin およびがん幹細胞マーカーである ALDH1A3 の発現量が高かった (図 1)。

(2) 脳転移巣に存在する脳転移開始細胞における上皮間葉転換マーカー、免疫関連分子、がん幹細胞マーカー、および転写因子の発現を RNA シーケンス解析で調べた。7 症例を解析した。上皮間葉転換マーカーである CDH1 (191 TPM)、SNAI1 (13 TPM)、および SNAI2 (4 TPM) の発現を認めた。また、がん幹細胞マーカーである SOX2 (370 TPM)、NES (42 TPM)、ALDH1A3 (34 TPM)、CD44 (28 TPM)、および PROM1 (27 TPM) を認めた。転写因子である SP2 (24 TPM) を認めた。ICOSLG 遺伝子の有意な発現は認めなかった。

(3) 肺癌脳転移の手術検体から 3 例の脳転移開始細胞の樹立に成功した。免疫組織化学法を用いて、ICOSLG タンパク質の発現を解析したところ、ICOSLG は脳転移開始細胞の細胞膜に局在していた (図 2)。

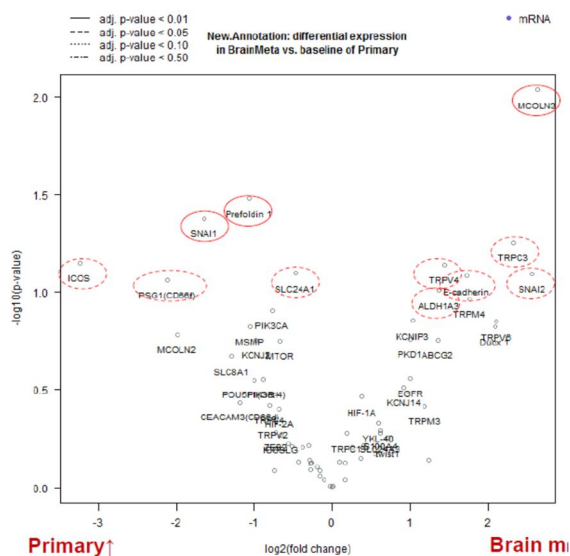


図 1 原発巣 (Primary) と脳転移巣 (Brain meta) におけるボルケーノプロット

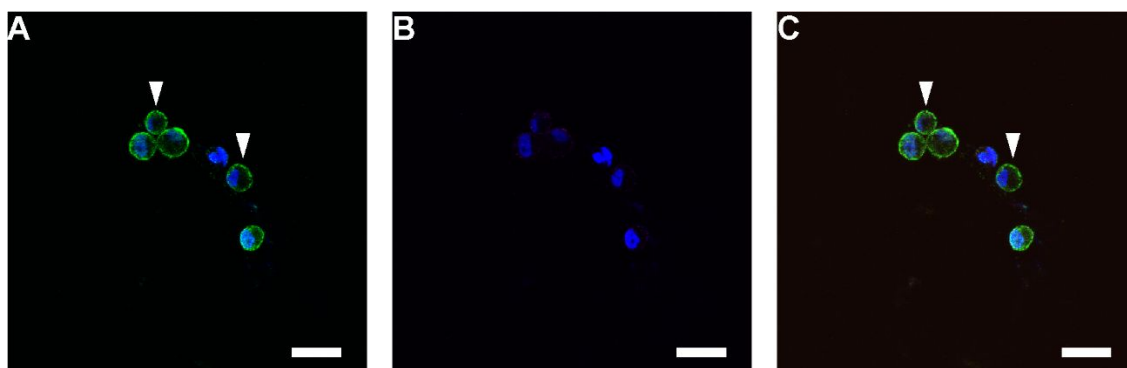


図 2 脳転移開始細胞における蛍光免疫染色。(A) ICOSLG (矢頭)、(B) CD44、および (C) は (A) と (B) のマージ。青は核染色。スケールは 20 μm

以上の研究成果は、ICOSLG が転移性脳腫瘍の治療の標的に成り得る可能性を示唆する。

#### < 引用文献 >

Kim SH, Ezhilarasan R, Phillips E, et al. Serine/Threonine Kinase MLK4 Determines Mesenchymal Identity in Glioma Stem Cells in an NF-kappaB-dependent Manner. Cancer Cell. 2016; 29(2):201-213.

Iwata R, Maruyama M, Ito T, et al. Establishment of a tumor sphere cell line from a metastatic brain neuroendocrine tumor. *Medical molecular morphology*. 2017; 50(4):211-219.

岩田 亮一, 丸山 正人, 大舟 晃平, ほか. 転移性脳腫瘍とがん幹細胞の関連. *Cytometry Research*. 2018; 28(1):13-18.

Iwata R, Lee JH, Hayashi M, et al. ICOSLG-mediated regulatory T cell expansion and IL-10 production promote progression of glioblastoma. *Neuro-Oncology*. 2020; 22(3):333-344.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Iwata Ryoichi, Lee Joo Hyoung, Hayashi Mikio, Dianzani Umberto, Ofune Kohei, Maruyama Masato, Oe Souichi, Ito Tomoki, Hashiba Tetsuo, Yoshimura Kunikazu, Nonaka Masahiro, Nakano Yosuke, Norian Lyse, Nakano Ichiro, Asai Akio	4. 巻 22
2. 論文標題 ICOSLG-mediated regulatory T cell expansion and IL-10 production promote progression of glioblastoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 333-344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/neuonc/noz204	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kibata Kayoko, Ito Tomoki, Inaba Muneo, Tanaka Akihiro, Iwata Ryoichi, Inagaki-Katashiba Noriko, Phan Vien, Satake Atsushi, Nomura Shosaku	4. 巻 Volume 10
2. 論文標題 The immunomodulatory-drug, lenalidomide, sustains and enhances interferon- production by human plasmacytoid dendritic cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Blood Medicine	6. 最初と最後の頁 217-226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/JBM.S206459	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 岩田 亮一、佐々木 庸、永島 宗紀、矢野 達也、鈴木 聡、江口 貴博、宮崎 晃一、栗林 厚介、須山 武裕、浅井 昭雄	4. 巻 48
2. 論文標題 急性期血栓回収術におけるNBCAを用いた動脈穿孔のトラブルシューティング	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 脳卒中の外科	6. 最初と最後の頁 375 ~ 378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2335/scs.48.375	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 岩田 亮一、須山 武裕、羽柴 哲夫、吉村 晋一、埜中 正博、浅井 昭雄	4. 巻 24
2. 論文標題 外傷性前脈絡叢動脈瘤に対して瘤内塞栓を行った一例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 NEUROSURGICAL EMERGENCY	6. 最初と最後の頁 196 ~ 200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24723/jsne.24.2_196	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 岩田 亮一, 須山 武裕, 吉村 晋一, 山村 奈津美, 磯崎 春菜, 李 一, 宮田 真友子, 内藤 信晶, 亀井 孝昌, 小森 裕美子, 島田 志行, 羽柴 哲夫, 埜中 正博, 浅井 昭雄	4. 巻 41
2. 論文標題 破裂脳動脈瘤に対するコイル塞栓術後の血腫増大例の検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 CI研究	6. 最初と最後の頁 87~93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 磯崎 春菜, 埜中 正博, 亀井 孝昌, 永島 史生, 岩田 亮一, 浅井 昭雄	4. 巻 44
2. 論文標題 小児eloquent areaの脳実質内腫瘍に対する覚醒下腫瘍摘出術	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 小児の脳神経	6. 最初と最後の頁 66~69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Ryoichi Iwata, Takehiro Suyama, Yi Li, Akio Asai
2. 発表標題 Usefulness of middle meningeal artery embolization with ultra-low concentration NBCA for intractable chronic subdural hematoma
3. 学会等名 2019WFNS (World Federation of Neurosurgical Societies) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩田 亮一, 佐々木 庸, 矢野 達也, 鈴木 聡, 山下 晋, 江口 貴博, 黒田 淳子, 宮崎 晃一, 栗林 厚介, 永島 宗紀, 浅井 昭雄
2. 発表標題 海馬梗塞による急性発症健忘における脳活バランスの有用性
3. 学会等名 第44回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩田 亮一, 須山 武裕, 吉村 晋一, 亀井 孝昌, 李 一, 島田 志行, 宮田 真友子, 山村 奈津美, 内藤 信晶, 羽柴 哲夫, 桢中 正博, 岩瀬 正顕, 浅井 昭雄
2. 発表標題 破裂脳動脈瘤塞栓術におけるadjunctive techniqueを要した治療成績
3. 学会等名 第24回 日本脳神経外科救急学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩田 亮一, 須山 武裕, 川野 晴香, 上野 勝也, 内藤 信晶, 山村 奈津美, 李 一, 武田 純一, 羽柴 哲夫, 吉村 晋一, 桢中 正博, 浅井 昭雄
2. 発表標題 プラスグレルが著効したステント内血栓症の2例
3. 学会等名 第35回NPO法人日本脳神経血管内治療学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩田 亮一, 林 美樹夫, 桢中 正博, 浅井 昭雄
2. 発表標題 GBMに対するICOSLGを標的とした新規治療法の開発
3. 学会等名 第30回日本サイトメトリー学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大石 哲也, 吉村 晋一, 岩田 亮一, 浅井 昭雄 (中瀬 裕之)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 三和書店	5. 総ページ数 300
3. 書名 プライム脳神経外科第3巻 脳・脊髄動静脈奇形と頭蓋内・脊髄硬膜動静脈瘻	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 窒素含有化合物、前記窒素含有化合物を含む組成物、及び腫瘍悪性度の予測マーカー	発明者 林 美樹夫, 池田 幸樹, 岩田 亮一	権利者 学校法人関西医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、JP2021/55869	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	The University of Alabama at Birmingham			
イタリア	University of Eastern Piedmont			